Ueber Spezifität und Wirkungsweise von Pankreastrypsin und Darmerepsin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der philosophischen Fakultät ⟨II. Sektion⟩ der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Hans Schlatter

aus Freinsheim

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555418_0052

Ueber Spezifität und Wirkungsweise von Pankreastrypsin und Darmerepsin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der philosophischen Fakultät ⟨II. Sektion⟩ der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Hans Schlatter

aus Freinsheim

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern!

Herrn Prof. Dr. E. Waldschmidt-Leitz, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, danke ich für seine stete Unterstützung und Fürsorge.

Herrn Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland, in dessen Institut die Arbeit zum größten Teil ausgeführt wurde, spreche ich für sein Entgegenkommen meinen ergebensten Dank aus.

Inhaltsangabe:

Ueber Spezifität und Wirkungsweise von Pankreastrypsin und Darmerepsin

Seite

A. Theoretischer Teil:

I. Ueber den Stand der Kenntnis von der Spezifität des Trypsins und des Erepsins 1

II. Ueber die Abgrenzung des Wirkungsbereiches von Pankreastrypsin und Darmerepsin an synthetischen Substraten 6

III. Ueber die spezifische Wirkungsweise von Trypsin und Erepsin

1. Strukturelle Voraussetzungen der Spezifität 11

2. Fraktionierter Abbau synthetischer Substrate 15

IV. Proteolytische Spezifität und Eiweißstruktur 19

B. Experimenteller Teil:

I. Ueber die Darstellung von Polypeptiden 20

II. Spaltbarkeit von Peptiden und Peptidderivaten 24

III. Beispiele des fraktionierten enzymatischen Abbaus von Peptiden . . 32

A. Theoretischer Teil.

I. Ueber den Stand der Kenntnis von der Spezifität des Trypsins und des Erepsins.

Von allen Forschungsmethoden, die zur Konstitutionsermittelung der Eiweißstoffe angewendet werden, dürften die enzymatischen wohl an erster Stelle dazu ausersehen sein, Licht in den schwer ergründlichen Aufbau dieser Naturkörper zu bringen. Infolge der milden Bedingungen, unter denen der Angriff der Fermente auf das Substrat erfolgt, ist es bei der enzymatischen Proteolyse viel unwahrscheinlicher, daß sekundäre chemische Reaktionen eintreten, die ein falsches Bild vom Aufbau der Eiweißmaterie vortäuschen, als zum Beispiel bei der radikalen Methode des Abbaus mit Alkalien und Säuren. Es ist das besondere Verdienst R. Willstätters und seiner Schule, in verhältnismäßig kurzer Zeit, die Enzymforschung soweit gefördert zu haben, daß wir heute in der Lage sind mit Hilfe der durch die Fermentwirkung erzielten Resultate weitgehende Hypothesen auf den verschiedenen Gebieten der Eiweißchemie aufstellen zu können. Die Untersuchung der Pankreasfermente und der Enzyme des Darms wurde durch E. Waldschmidt-Leitz und seine Mitarbeiter in den letzten Jahren mit großem Erfolg durchgeführt und zeitigte für den weiteren Verfolg dieser Arbeiten recht ermutigende Ergebnisse. Wollte man über die schon von E. Fischer und E. Abderhalden auf diesem Gebiet erzielten Resultate der fermentativen Eiweisforschung hinauskommen, so war es notwendig eine Methode zu finden, welche die Möglichkeit bot, die verschiedenen proteolytischen Enzyme der Pankreasdrüse von einander zu sondern. Bekanntlich ist diese Trennung der Enzyme in einer Arbeit von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck [1] in befriedigender Weise gelungen. Durch die Anwendung des Verfahrens der fraktionierten Adsorption an Tonerde, womit zuerst R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz [2] die Scheidung von Lipase, Trypsin und Amylase und fernerhin E. Waldschmidt-Leitz [3] die Trennung von Trypsin und Enterokinase bewerkstelligt hatten, wurde auch die Isolierung des Trypsins und des Erepsins der Pankreasdrüse durchgeführt. War es so möglich geworden einheitliche Fermente zu gewinnen,

[1] Ztschrft. physiol. Chem. 147. S. 286.
[2] Ztschrft. physiol. Chem. 125. S. 132.
[3] Ztschrft. physiol. Chem. 132. S. 181.

so konnte man jetzt an die Aufgabe herantreten ihre Spezifität und Wirkungsweise an geeigneten Substraten zu ergründen. Man suchte die Lösung dieses Problems dadurch zu erreichen, daß man gewissermaßen den Angriff an zwei Punkten eröffnete: Einerseits wollte man durch Fermentwirkung natürlich vorkommende Eiweißstoffe in einfacher oder fraktionierter Proteolyse zu ihren Bausteinen abbauen, auf der anderen Seite suchte man nach künstlichen Substraten vom Typ der Peptide, aus deren Spaltbarkeit man Schlüsse ziehen konnte sowohl auf den Spezifitätsbereich der Enzyme als auch auf die Struktur der in der Natur vorkommenden Eiweisskörper. Im Verlauf dieser Prüfungen erschien zunächst eine Arbeit von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck [1] über die spezifischen Wirkungen von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin. Als Substrate, die dem Angriff der getrennten Pankreasfermente, dem Trypsin und Erepsin, ausgesetzt wurden, wählten die Verfasser einfachere Peptide, ein Pepton der Pepsinverdauung, einfachere Proteine wie Protamin und Histon, ferner einige höher molekulare Proteine wie Casein, Fibrin, Gelatine, Gliadin und Zein. Bei der Untersuchung stellte sich nun heraus, daß die spezifischen Wirkungen beider Enzyme, strenger als zu erwarten gewesen wäre, sich unterscheiden ließen. Das Erepsin hydrolysierte alle untersuchten Dipeptide (auch das Tripeptid Leucyl—glycyl—glycin, das bisher als spaltbar für Trypsin gegolten hatte), während es sich gegenüber den natürlichen Eiweißkörpern als wirkungslos erwies. Im Gegensatz dazu wurden die Proteine durch Trypsin-Kinase weitgehend gespalten, während die Dipeptide und das Tripeptid von aktiviertem Trypsin nicht hydrolysiert werden konnten. Es ließ sich also in keinem Falle eine Vertretbarkeit der beiden Enzyme nachweisen.

Hand in Hand damit ging eine Untersuchung über die Bedeutung der Enterokinase als Aktivator des Trypsins. Wie die Ergebnisse zeigten, lassen sich Pepton und Clupein schon durch nicht aktiviertes Trypsin zerlegen, während die höheren Proteine erst nach Aktivierung mit Enterokinase angespalten werden.

Die neuen Erkenntnisse über die Spezifität der Pankreasenzyme führten zur scharfen Unterscheidung mehrerer Typen: „Zur ersten Gruppe, den Peptidasen, gehört das Erepsin, als dessen spezifische Substrate einfache Peptide, zum Beispiel Di- oder Tripeptide zu gelten haben; eine zweite Gruppe umfaßt die Enzyme vom Typus des nicht aktivierten Trypsins, dessen Wirkungen zwar nachgewiesen, aber noch nicht mit einem strengen spezifischen Substrate gekennzeichnet werden können, für die dritte Gruppe . . . . . ist das aktivierte Trypsin . . . . . anzusehen, für die vierte Gruppe endlich das Pepsin . . . . .“

In einer weiteren Arbeit von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner [2] gelang der Nachweis, daß für eine Verschiedenheit

[1] Ztschrft. physiol. Chem. 149. S. 203.
[2] Ztschrft. physiol. Chem. 151. S. 31.

des Darmerepsins vom Pankreaserepsin keine Anhaltspunkte mehr vorliegen, daß sie vielmehr als identisch zu betrachten sind.

Tabelle 1:

Spezifität von Pankreaserepsin und Pankreastrypsin.

(Angaben bedeuten: − = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse.)

Nr.	Substrat	Enzym	
		Pankreaserepsin	Pankreastrypsin
1	Alanyl-glycin	+	−
2	Glycyl-tyrosin	+	−
3	Glycyl-glycin	+	−
4	Leucyl-glycin	+	−
5	Leucyl-alanin	+	−
6	Pepton (ex albumine, Merk)	−	+
7	Clupein	−	+
8	Thymushiston	−	+
9	Casein	−	+
10	Fibrin	−	+
11	Gelatine	−	+
12	Gliadin	−	+
13	Zein	−	+
14	Eieralbumin	−	+
15	Ricinusglobulin	−	+

Das schon von O. Cohnheim [1] entdeckte und beschriebene Enzym der Darmschleimhaut wurde wie das Pankreasenzym durch die Anwendung des Tonerdeadsorptionsverfahrens aus der in Glyzerin aufgenommenen Darmschleimhaut isoliert und zeigte dann bei der Spezifitätsuntersuchung gegenüber den angewandten Substraten das gleiche Verhalten, wie das aus der Pankreasdrüse gewonnene Erepsin. Die Dipeptide wurden also gespalten, ein Pepton der Pepsinverdauung oder ein Protamin oder Histon oder sonstige Proteine blieben unbeeinflußt. Die Angaben der früheren Literatur über Spaltungen von Natureiweiß durch das Erepsin erwiesen sich als durch geringe Mengen beigemischten Trypsins verursachte Fehler. Mit dem einheitlichen Enzym konnte man nun versuchen, ob die ausgesprochene Erwartung, [2] „daß die fraktionierte enzymatische Hydrolyse einfacher Proteine zum Beispiel durch das einheitliche Trypsin oder Erepsin zu definierteren und gleichartigeren Reaktionsprodukten führen würde als sie bisher erhalten wurden", sich bestätigen würde. Zu diesem Zweck wurde das Clupein, als leichtest zugänglicher Körper aus der Protaminklasse, der fraktionierten

[1] B. 33. S. 451.
[2] Ztschrft. physiol. Chem. 147. S. 286.

Hydrolyse mit einheitlichen Enzymen unterzogen.[1]) Die Gruppe der Protamine, deren Zusammensetzung durch Kossel und seine Schule schon weitgehend aufgeklärt worden ist, erscheint nämlich für die enzymatische Hydrolyse besonders geeignet. Die relativ einfache Zusammensetzung (die geringe Anzahl von Bausteinen, der große Gehalt an Arginin, die kleine Zahl beteiligter Aminosäuren), die Unangreifbarkeit durch Pepsin, die Spaltbarkeit schon durch nicht aktiviertes Trypsin, bestimmen diese Körper zum geeigneten Versuchsobjekt. Die fraktionierte Hydrolyse des Clupeins durch die drei einheitlichen Proteasen Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin in wechselnder Reihenfolge ergab ein neuartiges Bild ihres spezifischen Wirkungsbereiches. Nach einer bestimmten Leistung kommt die Wirkung eines jeden Enzyms zum Stillstand. Diese Leistungen der Fermente stehen zueinander in einfachen ganzzahligen Verhältnissen. An Hand der nachfolgenden Tabelle läßt sich ersehen, daß unter den lösbaren Bindungen im Proteinmolekül Gruppen zu unterscheiden sind, die mit Fünfteln und Dritteln am Gesamtabbau beteiligt sind. Aus dem Befund, daß der Wirkungsbereich der Enzyme, wenngleich mit der Reihenfolge wechselnd, sich stets in einfachen ganzzahligen Verhältnissen ausdrückt, ergibt sich

Tabelle 2:

Hydrolyse des Clupeins durch Trypsin, Trypsin-Kinase, Erepsin; Reihenfolge und Leistung.

(Hydrolyse von 0,20 g Clupeinsulfat = 0,142 g wasser- und aschefreies Clupein; Leistungseinheit angenommen entspr. 0,90 ccm 0,2 n — COOH.)

Vers. Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0,2 n) COOH	Zuwachs (ccm 0,2 n) NH_2	Leistung	Leistungs-Verhältnis
1	Trypsin	0,9	0,9	1,0 ± 0,03	1
	Trypsin-Kin.	2,67	2,36	3,0 ± 0,04	3
	Darmerepsin	0,94	0,96	1,0 ± 0,05	1
	Summe	4,51	4,22	5,0	
2	Trypsin	0,92	0,92	1,0 ± 0,03	1
	Darmerepsin	0,93	0,98	1,0 ± 0,03	1
	Trypsin-Kin.	0,89	0,83	1,0 ± 0,04	1
	Darmerepsin	1,7	1,58	1,9 ± 0,07	2
	Summe	4,44	4,31	4,9	
3	Trypsin-Kin.	3,13	3,15	3,5 ± 0,03	2
	Darmerepsin	1,53	1,72	1,7 ± 0,04	1
	Summe	4,66	4,87	5,2	

[1]) E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Graßmann, Ztschrft. physiol. Chem. 156. S. 68.

die Feststellung der chemischen Einheitlichkeit des Protamins oder die Annahme eines Gemisches im enzymatischen Verhalten gleichartiger Komponenten. Durch Vergleich der Versuche eins und drei erkennt man ferner, daß die Trypsinwirkung bei Clupeinhydrolyse bei alleiniger Aufspaltung mit Trypsinkinase und Erepsin sich zu ähnlichen Anteilen zu der Wirkung dieser beiden Enzyme addiert. Aus den Untersuchungen wird gefolgert, daß die Spezifität der einzelnen Proteasen sich weniger auf die Spaltung verschiedener chemischer Bindungen bezieht, sondern, daß vielmehr die Natur oder die Anzahl der benachbarten Aminosäuren oder Peptidkomplexe maßgebend sei. Als Feststellung von allgemeiner Bedeutung dürfte die Tatsache zu werten sein, daß die freigelegten Mengen von NH_2 und COOH-Gruppen in jedem Falle übereinstimmen, daß also nur Peptidbindungen gelöst werden. Auch die fraktionierte Hydrolyse eines höher molekularen Proteins, des Caseins, ergab ähnliche quantitative Befunde, wiewohl der Abbau hier nur unvollständig war.[1] Die enzymatische Hydrolyse erleidet im Falle hochmolekularer Proteine starke Störungen durch Hemmungserscheinungen von Spaltprodukten, die sich experimentell nur schwer überwinden lassen.

Zusammenfassend lassen sich also die in den oben geschilderten Arbeiten erzielten Ergebnisse über die Spezifität der proteolytischen Enzyme, Trypsin und Erepsin, dahin formulieren, daß:

1. das Erepsin nur imstande ist künstliche Substrate, von der Art einfacher Di- oder Tripeptide zu hydrolysieren, daß dagegen natürlich vorkommende Substrate nicht angegriffen werden, wenn nicht vorher ein anderes Ferment schon einen gewissen Abbau bewirkt hat.
2. daß das Trypsin, bezw. die Komposition Trypsin-Kinase, als spezifisches Verdauungsferment für Natureiweißkörper zu gelten hat, daß dagegen künstliche Substrate bisher nicht gefunden waren, die durch Trypsin oder Trypsin-Kinase sich als hydrolysierbar erwiesen.

Es ergab sich infolgedessen von selbst das Programm weitere Spezifitätsuntersuchungen anzustellen um durch eine Begrenzung der Bedingungen, unter denen der Fermentangriff erfolgt, in der Lage zu sein die Zahl der möglichen Vermutungen über die Konstitution der Eiweißstoffe zu verringern. Für die Abgrenzung des Spezifitätsbereiches des Erepsins war es zunächst notwendig festzustellen, ob die von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck[2] gemachte Erfahrung, daß als spezifische Substrate des Erepsins Di- und Tripeptide zu gelten haben, ausschließlich auf diese Körperklasse sich beschränkt oder ob daneben nicht noch andere, höhere Polypeptide als spezifische Substrate der Erepsinverdauung anzusehen sind. Die Vermutung lag nahe, daß irgendwo, bei einer bestimmten Länge

[1] E. Waldschmidt-Leitz und Simons, Ztschrft. physiol. Chem. 156. S. 99.
[2] Ztschrft. physiol. Chem. 147. S. 286.

der Peptidkette, eine Grenze der ereptischen Wirksamkeit liegen müsse, wo dann das Trypsin allein als hydrolysierendes Ferment in Frage kam. Eine Stütze für diese Ansicht ergaben insbesondere die Versuche am Clupein [1] Casein [2] und Histon [3], wo die Hydrolyse mit der tryptischen Komponente einsetzte und mit der ereptischen weitergeführt werden konnte. Auf der anderen Seite war damit zu rechnen, daß vielleicht auch die chemische Struktur der am Aufbau beteiligten Aminosäuren einen bestimmten Einfluß auf den Fermentangriff habe. Die Untersuchung des Spezifitätsbereiches der beiden Enzyme versprach also auch einen Einblick in die Bedingungen zu gewähren, unter denen überhaupt der Angriff der Fermente erst möglich wird. Trotzdem gerade die letzten Jahre eine zahlreiche Literatur über des Trypsin gebracht hatten, war es nicht möglich gewesen eine einigermaßen brauchbare Theorie über die Angriffsweise dieses Enzyms zu entwickeln, was eben dadurch bedingt war, daß man bei den Arbeiten mit Trypsin mit zwei Unbekannten, Enzym und Substrat, zu rechnen hatte. Die Auffindung eines Substrates bekannter Konstitution, das sich als trypsinspaltbar erwies, versprach einen vertieften Einblick in das Wesen der Enzyme sowohl wie in den strukturellen Aufbau der Eiweißkörper. Naturgemäß waren für die Suche nach einem derartigen, für Trypsin spezifischen Substrate die gleichen Gesichtspunkte wegleitend wie beim Erepsin, nämlich die Frage nach dem Einfluß der Länge der Peptidkette und der chemischen Natur der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäurereste.

II. Ueber die Abgrenzung des Wirkungsbereiches von Pankreastrypsin und Darmerepsin an synthetischen Substraten.

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung erfolgte zunächst die Prüfung einer Reihe von Dipeptiden und höheren Peptiden bis zum Oktadekapeptid Leucyl—triglycyl—leucyl—triglycyl—leucyl—oktaglycyl—glycin. Wie ein Blick auf die folgende Tabelle 3 (Nr. 20 bis 28) zeigt, waren diese höheren Peptide alle so aufgebaut, daß als Bausteine lediglich einfache Leucin- und Glycinreste Verwendung fanden. (Nur verschiedene Dipeptide enthielten einige andere Aminosäuren als Bausteine, ohne daß dadurch jedoch ein von den Glycin- und Leucinpolypeptiden verschiedenes Verhalten bei der enzymatischen Untersuchung sich gezeigt hätte.) Sämtliche Substrate werden nämlich, ohne Rücksicht auf die Länge der Peptidkette, durch Erepsin zerlegt, während sie sich dem aktivierten Trypsin gegenüber als resistent erweisen. Von den geprüften Dipeptiden, unter

[1] E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, Ztschrft. physiol. Chem. 156. S. 68.

[2] E. Waldschmidt-Leitz und Simons, Ztschrft. physiol. Chem. 156. S. 99.

[3] E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner, Ztschrft. physiol. Chem.

Tabelle 3:
Spezifität von Pankreastrypsin und Darmerepsin gegenüber Polypeptiden.
(Angaben bedeuten: − = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse, o = nicht geprüft.)

	Peptid	Erepsin	Trypsin aktiviert
1	Glycyl—glycin	+	−
2	Leucyl—glycin	+	−
3	Glycyl—tyrosin	+	−
4	Leucyl—leucin	+	−
5	Alanyl—serin	+	−
6	Leucyl—methylisoserin	+	−
7	Histidyl—glycin	+	−
8	Glycyl—cystin	+	−
9	Dileucyl—cystin	+	−
10	Leucyl—glutaminsäure	+	−
11	Alanyl—tyrosin	+	−
12	Phenylalanyl—glutaminsäure	+	o
13	Alanyl—β-aminobuttersäure	+	o
14	Leucyl—β-aminobuttersäure	+	o
15	Glyzyl—α-amino—n—capronsäure	+	o
16	Alanyl—δ-amino—n—capronsäure	+	o
17	Leucyl—ε-amino—n—capronsäure	+	o
18	Diarginintrinitrat	−	−
19	Triglycin	+	−
20	Tetraglycin	+	−
21	Leucyl—triglycin	+	−
22	Pentaglycin	+	−
23	Leucyl—triglycyl—leucin	+	−
23	Leucyl—triglycyl—leucin	+	−
24	Hexaglycin	+	−
25	Leucyl—heptaglycin	+	−
26	Leucyl—nonoglycin	+	−
27	Leucyl—triglycyl—leucyl—triglycyl—leucyl—okta—glycyl—glycin	+	−
28	Phenylalanyl—glycin	+	+
29	Phenylalanyl—arginin	+	+
30	Leucyl—glycyl—tyrosin	o	+
31	Glycyl—alanyl—tyrosin	+	+
32	Glycyl—tyrosyl—glycin	+	+
33	Glycyl—alanyl—glycyl—tyrosin	+	+
34	Leucyl—triglycyl—phenyl—alanin	+	+
35	Leucyl—triglycyl—tyrosin	−	+

welchen auch Derivate nicht natürlich vorkommender Aminosäuren, so der β—Aminobuttersäure, der α—, sowie der ε—Amino—n—capronsäure sich als erepsinspaltbar erwiesen haben, schien nur das Diarginintrinitrat, nach der Anschauung von E. Fischer und Suzuki[1] ein Salz des Arginyl—arginins, durch seine Resistenz ausgezeichnet zu sein; es erschien zweifelhaft [2], ob diesem Präparate, das nach den Erfahrungen von Fischer und Suzuki auch bei der Behandlung mit Säure nicht hydrolysiert wurde, die angenommene Zusammensetzung zukommt, oder ob man ihm nicht vielmehr in Anlehnung an neuere Beobachtungen von A. Kossel und W. Staudt [3] anhydridartige Struktur zuzuschreiben hat. Inzwischen ist in einer neu erschienenen Arbeit von Bergmann und Zervas [4] der sichere Beweis für diese Anschauung erbracht worden. Dem Arginyl—arginin E. Fischers kommt darnach die Konstitution eines Bisguanidino—n—valeriansäure—anhydrids zu.

Die in der Tabelle 3 (Nr. 1 bis 28) aufgezeichneten Ergebnisse, Spaltbarkeit von Polypeptiden aus Glycin- und Leucinresten durch Erepsin, Unangreifbarkeit durch Trypsin-Kinase berechtigen zu dem Schluß, daß für den Spezifitätsunterschied beider Enzyme eine Verlängerung der Kette in Peptiden aus einfachen aliphatischen Monoaminomonocarbonsäuren durch Einführung lediglich von Glycin- und Leucinresten bis zum Oktadekapeptid als bedeutungslos befunden wird. Auch das höchste von E. Fischer [5] aus Glycin und Leucin aufgebaute Peptid, das Oktadekapeptid Leucyl—triglycyl—leucyl—triglycyl—leucyl—nonoglycin, wird nur vom Erepsin, garnicht von dem tryptischen Enzmy angegriffen. (Tab. 3 Nr. 27).

Eine gleichartige Aussage wird von E. Abderhalden für ein ähnliches aus 19 Aminosäureresten aufgebautes Peptid gemacht. [6]

Im weiteren Verlauf dieser Spezifitätsuntersuchungen wurden indes, wie die Tabelle 3 (Nr. 29 bis 36) zeigt, auch einige Peptide gefunden, die eine Hydrolyse durch Trypsin-Kinase erfuhren. War man zunächst [7] zu der Ansicht geneigt gewesen, daß alle Dipeptide als spezifische Substrate des Erepsin zu gelten haben, so erfährt diese Hypothese eine Berichtigung insofern, als durch die Spaltbarkeit des Phenylalanyl-glycins und des Phenylalanyl-arginins durch Trypsin-Kinase die Notwendigkeit zu der

[1] B. 38. S. 173.
[2] B. 61. S. 299. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein.
[3] Ztschrft. physiol. Chem. 170. S. 91.
[4] B. 61. S. 1195.
[5] B. 42. S. 1754.
[6] Ztschrft. physiol. Chem. 151. S. 151.
[7] E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, Ztschrft. physiol. Chem. 149. S. 206. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschrft. physiol. Chem. 151. S. 31. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein B. 61. S. 299.

Einschränkung sich ergibt, daß nicht jedes Dipeptid als spezifisches Erepsinsubstrat angesehen werden darf.

Indes zeigt Tabelle 3 (Nr. 28 bis 35) deutlich, daß die Angreifbarkeit eines Peptides durch Trypsin-Kinase bedingt wird durch die besondere Natur der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäuren. Als solche, durch besondere Konstitution ausgezeichnete Peptidbausteine, kommen nach den vorliegenden Ergebnissen das Phenylalanin und das Tyrosin in Frage. Nach Beobachtungen von E. Abderhalden sind auch das Tryptophan und das Cystin [1] dazu zu rechnen. Indes spielt hier auch die Länge der Peptidkette eine wichtige Rolle. Das Dipeptid Glycyl—tyrosin (Tab. 3 Nr. 3) hat noch als spezifisches Substrat des Erepsins zu gelten. Im Gegensatz dazu werden die Tripeptide Leucyl—glycyl—tyrosin und Glycyl—alanyl—tyrosin auch vom Trypsin gespalten. Aber sie unterliegen daneben, gleichwie das Tetrapeptid Glycyl—alanyl—glycyl—tyrosin auch noch dem Angriff des Erepsins. Erst das Pentapeptid Leucyl—triglycyl—tyrosin ist als spezifisches Trypsinsubstrat anzusehen. Die Angreifbarkeit der tyrosinhaltigen Tri- und Tetrapeptide durch Trypsin und Erepsin zugleich ist indessen nicht mit einer Identität beider Enzymwirkungen zu deuten, sondern findet, wie in einem späteren Abschnitt geschildert wird, ihre Erklärung in einer verschiedenen Angriffsweise der Enzyme. Für die Derivate des Phenylalanins scheinen die gleichen Gesetzmäßigkeiten Geltung zu besitzen, nur erweist sich in diesem Falle auch noch das Pentapeptid Leucyl—triglycyl—phenylalanin als für beide Enzyme spaltbares Substrat.

Da durch die oben erwähnten Ergebnisse bewiesen ist, daß neben der Länge der Peptidkette auch die chemische Struktur der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäuren maßgebend ist, schien es geboten noch andere, durch CO-NH-Bindung ausgezeichnete, also peptidartige, Körper auf ihr Verhalten gegenüber den proteolytischen Enzymen, Darmerepsin und Pankreastrypsin, zu prüfen. Diese Untersuchung erstreckte sich auf die in der folgenden Tabelle 4 zusammengefaßten Derivate, nämlich auf am Carboxyl oder an der NH_2-Gruppe oder an beiden Stellen gleichzeitig substituierte Peptide. Wie die Tabelle zeigt, wurden also Dioxopiperazine, Peptidamide, ein Carbäthoxyl—peptidamid und eine Anzahl von Acyl- und Halogenacylderivaten der enzymatischen Proteolyse unterzogen. Wenn auch eine Reihe dieser Körper in der Natur nicht vorkommt, so darf doch angenommen werden, daß ihre Untersuchung manchen Fingerzeig für die Kenntnis der Enzymspezifität gewähren wird.

Wie eine Analyse der Tabelle ergibt, haben die Substrate vom Typ der Dioxopiperazine für das Erepsin sowohl wie für das Trypsin als unspaltbar zu gelten. Damit wird ein, schon von E. Waldschmidt-Leitz und

[1] Naturw. 16. S. 396.

Tabelle 4:

Spezifität von Darmerepsin und Pankreastrypsin gegenüber an der COOH- oder NH_2-Gruppe substituierten Peptiden.

(Angaben: + = positive, — = keine nachweisbare Hydrolyse, o = nicht geprüft.)

Nr.	Substrat	Erepsin	Trypsin
1	Glycin—anhydrid	—	—
2	Glycyl—alanin—anhydrid	—	—
3	Alanyl—phenylalanin—anhydrid	—	—
4	Glycyl—serin—anhydrid	—	—
5	Phenyl—dioxopiperazin	—	—
6	Glycyl—leucin—amid	+	—
7	Tetraglycin—amid	+	—
8	Carbäthoxyl—tetraglycin—amid	—	—
9	Benzoyl—alanyl—decarboxy—leucin	o	—
10	β-Naphtalinsulfonyl—glycyl—tyrosin	—	+
11	Bromisocapronyl—oktaglycyl—glycin	—	—
12	Bromisocapronyl—trigylcyl—leucyl—oktaglycyl—glycin	—	o
13	Glycyl—glycin—carbonsäure	—	o
14	Carbäthoxyl—glycyl—leucin	—	+
15	Carbäthoxyl—pentaglycin	—	o
16	Acetyl—glycyl—glycin	—	+
17	Acetyl—phenylalanyl—alanin	—	+
18	Benzoyl—glycyl—glycin	—	+
19	Benzoyl—triglycin	—	+
20	Benzoyl—tetraglycin	—	o
21	Benzoyl—pentaglycin	—	—
22	Phtalyl—glycyl—glycin	o	+
23	Bromisocapronyl—glycyl—glycin	—	—
24	Bromisocapronyl—glycyl—tyrosin	—	+
25	Chloracetyl—phenylalanin	—	+
26	Chloracetyl—tyrosin	—	+

A. Schäffner [1] gemachter Befund bestätigt und erweitert. Aus dem Beispiel des Glycyl—leucinamids und des Tetraglycinamids ist ersichtlich, daß bei einer Amidierung der Carboxylgruppe keine Aenderung in der ereptischen Spaltbarkeit des Peptides zutage tritt.

Nach Euler und Josephson [2] ist das Gleiche bei Peptidestern der Fall. Durch Acylierung des Peptid-

[1] B. 58. S. 356.

[2] Ztschrft. physiol. Chem. 157. S. 122. 162. S. 85.

amids allerdings ⟨S. Tab. 4 Nr. 8⟩ erlischt die Möglichkeit der Erepsinspaltbarkeit, während Trypsin in keinem Falle, weder Amid noch Ester noch Acylpeptidamid angreift. Wie man sieht ⟨Tab. 4 Nr. 10 bis 26⟩ lassen sich eine Reihe von Acylderivaten von Peptiden durch Trypsin-Kinase spalten [1]⟩, während die dazugehörigen, nicht acylierten, Peptide durch das Trypsin nicht angegriffen werden. Andererseits ging mit der Acylierung die Eigenschaft der Erepsinspaltbarkeit verloren. Diese Feststellung der Spezifitätsänderung der nur erepsinspaltbaren Peptide durch Acylierung ⟨gleich ob Naphtalinsulfonyl-, Phtalyl-, Benzoyl-, Acetyl- oder Carbäthoxyl- eingeführt wird⟩ hat allgemeine Gültigkeit. Außerdem ist es beachtenswert, daß mit der Länge der acylierten Peptidkette der Einfluß des die tryptische Spaltbarkeit bedingenden Acylrestes abnimmt, wie am Beispiel der benzoylierten Glycinpeptide erkenntlich ist. Es ist möglich, ja wahrscheinlich, daß auch hier mit Aenderung der beteiligten Aminosäuren die spezifischen Eigenschaften sich ändern, daß also vielleicht bei einer Tyrosin- oder Phenylalanin-Kette auch bei langer Reihe die Angreifbarkeit durch Trypsin-Kinase nicht aufgehoben wird.

Wir stehen also vor der Tatsache, daß eine Reihe von Peptiden und Peptidderivaten durch Erepsin und Trypsin-Kinase hydrolysiert wird, ohne daß man durch eine sichere Formulierung angeben könnte, wieweit der Spezifitätsbereich jedes Fermentes geht. Die mutmaßlichen Ursachen dieses Verhaltens sollen im folgenden Abschnitt erörtert werden.

III. Ueber die spezifische Wirkungsweise von Trypsin und Erepsin:

1. Strukturelle Voraussetzung der Spezifität.

Sucht man die erzielten Ergebnisse nach der Frage der spezifischen Wirkungsweise der Enzyme auszuwerten, so ergeben sich einige sichere Feststellungen, die einen erweiterten Einblick in das Wesen der Fermentwirkung gestatten.

Die Tabellen bieten zunächst eine Handhabe für die Beurteilung der Angriffsweise der Enzyme. Aus der Tatsache der Angreifbarkeit von Peptiden, Peptidamiden und Peptidestern, aus der der Unangreifbarkeit der Dioxopiperazine und der untersuchten Acyl- und Halogenacylderivate von Peptiden für das ereptische Enzym, läßt sich der Schluß ziehen, daß das Erepsin unbedingt einer freien NH_2-Gruppe zur Hydrolyse bedarf, eine Ansicht, die schon H. v. Euler und R. Josephson [2]⟩ geäußert haben. Eine Veränderung an der Carboxylgruppe der

[1]⟩ Nach einer Arbeit von E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein.
[2]⟩ Ztschrft. physiol. Chem. 157. S. 122, 162. S. 85, 166. S. 294.

Substrate, zum Beispiel eine Amidierung oder Veresterung ist für den Angriff des Erepsins belanglos. Andererseits zeigen die Versuche, daß für die Aufspaltungsmöglichkeit eines Substrates mit Trypsin-Kinase die Gegenwart einer freien NH_2-Gruppe entbehrlich ist. Durch die Angreifbarkeit einer Reihe von Acylkörpern dürfte dieser Befund hinreichend gesichert sein. Dagegen werden Peptide und Peptidderivate, deren Carboxylgruppe amidiert oder verestert ist oder in denen sie fehlt, durch das tryptische Enzym nicht mehr beeinflußt. Andererseits wurden bisher keine Peptide oder Derivate von solchen gespalten die nicht über eine freie Carboxylgruppe verfügten. Es darf deshalb der Gedanke, daß das Trypsin zur Betätigung seiner Fermentwirkung einer freien Carboxylgruppe bedarf, als erwiesen angesehen werden.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde am Beispiel der Tyrosinderivate ⟨Glycyl—tyrosin, Leucyl—glycyl—tyrosin, Leucyl—triglycyl—tyrosin⟩ gezeigt, daß nicht die Länge der Peptidkette oder die chemische Struktur der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäuren für die tryptische oder ereptische Angreifbarkeit des Substrates verantwortlich ist, sondern, daß beide Einflüsse zusammen das spezifische Verhalten gegenüber den Fermenten bedingen. Es steht außer Zweifel, daß dabei feinste Abstufungen in Frage kommen. Wird doch zum Beispiel das nur durch eine OH-Gruppe vom Leucyl—triglycyl—tyrosin verschiedene Leucyl—triglycyl—phenylalanin, im Gegensatz zum genannten Peptid, noch von beiden Enzymen angegriffen.

Man geht kaum fehl, wenn man die Spaltbarkeit der trypsinangreifbaren Substrate mit einem gewissen elektronegativen Charakter der beteiligten Aminosäuren in Verbindung bringt. Zur Erzeugung dieser Eigenschaft scheint bei den Phenylalaninderivaten der Einfluß des Phenylrestes auf die COOH-Gruppe auszureichen, dessen Wirkung bei den Tyrosinpräparaten durch die sauere OH-Gruppe noch verstärkt wird. Dieser elektronegative Charakter bestimmter Peptidbausteine scheint seinen Einfluß auf die Wirkung beider Enzyme zu erstrecken.

Bekanntlich sind die Aminosäuren und Peptide als sogenannte amphotere Körper aufzufassen. Je nach der chemischen Natur der am Aufbau eines Peptids beteiligten Aminosäuren ist nur der isoelektrische Punkt der verschiedenen Peptide mehr oder weniger nach der saueren Seite verschoben. So ergaben neuere, noch unveröffentlichte Messungen von G. v. Schuckmann für das Glycyl—glycin und das Glycyl—tyrosin Werte von 5,6 beziehungsweise 3,8. Im vorliegenden Falle wurde also durch den Austausch des endständigen Glycins im Glycyl—glycin gegen Tyrosin der isoelektrische Punkt des Dipeptids deutlich nach der saueren Seite verlegt. Bekanntlich hat sowohl das Glycyl—glycin als auch noch das Glycyl—tyrosin als spezifisches Substrat für Erepsin zu gelten. Man geht kaum fehl, wenn man den isoelektrischen Punkt des

Leucyl—glycyl—tyrosins, das als nächst höheres Tyrosinpeptid schon von Trypsin-Kinase gespalten wird, noch weiter nach der saueren Seite hin annimmt als beim Glycyl—tyrosin. Bei Präparaten, die sich nur noch trypsinspaltbar erweisen, von Erepsin dagegen nichtmehr angegriffen werden, ist der isoelektrische Punkt sicher noch weiter im saueren Gebiet zu suchen. Durch das Verhalten der Acylderivate der Peptide wird die oben geäußerte Ansicht betreffs des elektronegativen Charakters der trypsinspaltbaren Peptide bestärkt und man wird diese Acylkörper vielleicht als ideale Modelle der Trypsinverdauung anzusehen haben. Mit der von Northrop [1] bei der Proteinspaltung gemachten Erfahrung: „Alle Verdauungskurven lassen erkennen, daß die Reaktion zwischen Protein und Enzym eine Funktion der Koncentration an ionisiertem Protein darstellt. Das Trypsin reagiert mit negativ geladenen Proteinionen", stehen die vorliegenden Ergebnisse nicht in Widerspruch, im Gegenteil ist es recht gut denkbar, daß das Trypsin mit den Peptidanionen sich verbindet. Die Ansicht, daß die Anlagerung des Trypsins an ein Substrat durch dessen elektrochemischen Charakter bedingt ist, daß sie durch eine gewisse elektronegative Natur desselben begünstigt oder sogar erst ermöglicht wird, entspricht auch dem sonstigen elektrochemischen Verhalten des Trypsins zum Beispiel seinem Adsorptionsverhalten; von den untersuchten Pankreasenzymen hat das „Trypsin die stärksten basischen Eigenschaften" [2]; auch war hervorgehoben „daß das Adsorptionsverhalten . . . . . von Pankreastrypsin . . . . . unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe . . . zur Geltung kommt" [3].

Für die Angreifbarkeit eines Substrates durch Erepsin sind prinzipiell die gleichen Voraussetzungen gültig wie beim Trypsin, das heißt also, daß auch hier der isoelektrische Punkt des Substrates von ausschlaggebender Bedeutung für die Möglichkeit eines Fermentangriffs ist. Der isoelektrische Punkt der erepsinspaltbaren Peptide liegt aber im schwächer saueren Gebiet wie der der spezifischen Trypsinsubstrate, was sich aus den oben angegebenen and anderen bekannten Werten für die Messung des isoelektrischen Punktes von erepsinspaltbaren Peptiden ergibt. Die Anschauung über die spezifische Wirkungsweise eines Enzyms geht also dahin, daß die beiden proteolytischen Enzyme, jedes für sich, nur wirksam sind gegenüber solchen Substraten, deren isoelektrischer Punkt innerhalb eines bestimmten Bereiches liegt. Dabei hat das Trypsin als spezifisches Ferment für die mehr sauere Seite zu gelten, während das Erepsin gegenüber solchen Peptiden wirksam wird, deren isoelektrischer Punkt mehr in der neutralen Richtung liegt. Genaue Messungen, durch die der Wirkungsbereich der einzelnen Fermente scharf abgegrenzt wird, fehlen zur Zeit noch.

---

1) C. 23. I. S. 782.
2) R. Willstätter. B. 55. S. 3601.
3) E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner. Ztschrft. physiol. Chem. 151. S. 31.

Was die Angriffsweise des Erepsins anbelangt so ist es bisher noch nicht möglich gewesen Klarheit darüber zu schaffen, ob das Ferment mit der dissoziierten oder der undissoziierten NH_2-Gruppe in Reaktion tritt.

Am praktischen Beispiel der Tyrosinpeptide lassen sich die erzielten Spaltungsergebnisse folgendermaßen erklären: Das Glycyl—tyrosin, dessen elektronegativer Charakter noch nicht ausgeprägt genug ist, um das Peptid trypsinspaltbar zu machen, wird nur durch Erepsin verdaut. Im Leucyl—glycyl—tyrosin dagegen haben sich die Bedingungen schon so zu Gunsten des Trypsins verschoben, daß auch dieses Ferment, neben dem Erepsin, das Tripeptid zu hydrolysieren vermag. Der isoelektrische Punkt liegt also bereits in dem für Trypsinspaltung charakteristischen p_H-Gebiet; gleichzeitig fällt er aber auch noch in den für Erepsinangreifbarkeit gültigen Bereich. So erklärt sich die Angreifbarkeit von verschiedenen Peptiden durch Trypsin sowohl als auch durch Erepsin. Beim Tetrapeptid haben wir noch annähernd die nämlichen Zustände; erst beim Pentapeptid, Leucyl—triglycyl—tyrosin, ist der isoelektrische Punkt soweit nach der „Trypsinseite" verschoben, daß dieses Peptid als spezifisches Trypsinsubstrat zu gelten hat. Die elektronegativen Eigenschaften eines Peptids werden also durch Zwischenschaltung von Peptidketten zwischen freie NH_2- und COOH-Gruppe verstärkt. Wahrscheinlich üben die CO-NH-Bindungen diesen Einfluß aus, sodaß man sagen kann, daß mit der wachsenden Zahl, zwischen COOH und NH_2 liegender CO-NH-Bindungen, der elektronegative Charakter eines Peptides verstärkt wird. Daß beim Leucyl—triglycyl—phenylalanin noch Spaltbarkeit durch beide Enzyme vorliegt, beweist den hohen Empfindlichkeitsgrad der Enzyme. Offenbar wird durch das Ausfallen der OH-Gruppe am Benzolring, wodurch sich ja dieses Peptid vom entsprechenden Tyrosinpräparat unterscheidet, bewirkt, daß noch die für Erepsinspaltung nötigen Bedingungen gegeben sind. Mit der Verlängerung der Peptidkette durch mehr Leucin- oder Glycinreste wird indes vermutlich auch hier bald die Grenze ereptischer Angreifbarkeit erreicht sein. Ohne Zweifel ist die Distanz der freien NH_2- von der COOH-Gruppe von entscheidendem Einfluß auf die enzymatische Spaltbarkeit des Peptids, wobei von Fall zu Fall, je nach Art der Bausteine, feinere strukturelle Unterschiede das spezifische Verhalten, vielleicht richtiger gesagt, des Substrates als des Fermentes bei der Verdauung bewirken.

Ob für den Angriff beider Enzyme noch andere, sogenannte Haftstellen, in Frage kommen, ist heute mit Sicherheit nicht anzugeben, weil das vorhandene Material nicht ausreicht um diese Frage genügend beantworten zu können. Doch die Tatsachen der Entbehrlichkeit der NH_2-Gruppe bei der Trypsinspaltung einerseits, die Entbehrlichkeit der freien Carboxylgruppe für Erepsinspaltung andererseits lassen den Schluß zu, daß diese beiden Gruppen für eine etwaige zweite Angriffsstelle wechselweise auszuscheiden haben.

Es blieben somit nur noch bestimmte andere Gruppen der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäuren als Haftstellen übrig. Von diesen kommt allein die Verbindungsstelle zweier Aminosäuren in Frage, wo die Gruppe CONH die Möglichkeit zum Angriff bietet. Ob an der CONH-Bindung, beziehungsweise ihrer Enolform, ein zweiter Angriff des Fermentes erfolgt, wird möglicherweise dadurch zu entscheiden sein, daß man die beim Abbau von Racematen gemachten Erfahrungen, welche im folgenden Abschnitt besprochen werden, bei der Prüfung der Frage der zweiten Haftstelle berücksichtigt.

Mit Sicherheit darf man sagen, daß die Wirkung beider Enzyme sich nur auf die Lösung von CONH-Bindungen erstreckt, was in der vorliegenden Untersuchung zum erstenmale für das Trypsin an synthetischem Material gezeigt wurde. Diese in jedem Falle beobachtete Tatsache der ausschließlichen Lösung von Peptidbindungen, welche die Versuchsergebnisse beim Clupein stützt, ist eine wertvolle Bereicherung der analytischen Gesichtspunkte zur Untersuchung von Eiweißkörpern. In jedem Falle (siehe folgenden Abschnitt) wurde gezeigt, daß die Hydrolyse der Peptide im Falle der Einwirkung tryptischen Fermentes vom freien Carboxylende her erfolgt ist. Man ist geneigt anzunehmen, daß auch die Acylpeptide eine Aufspaltung durch Trypsin-Kinase im gleichen Sinne erleiden. Die im vorangehenden Abschnitt rein qualitativ und im praktischen Teil quantitativ belegten Befunde der Versuche zeigen indes nicht die erwarteten Ergebnisse, indem die hydrolysierende Wirkung vom niedrigeren zum höheren Acylpolypeptid abnimmt. Die geringere Spaltung von höheren Acylpeptiden gegenüber der größeren niedrigerer dürfte vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß die höheren Acylpeptide viel langsamer mit dem Enzym reagieren als die aus weniger Aminosäuren zusammengesetzten.

2. Fraktionierter Abbau synthetischer Substrate.

War in den vorausgegangenen Kapiteln der Hauptwert auf die Feststellung der spezifischen Angriffsweise der Enzyme gelegt, so soll jetzt der Wirkungsbereich beim fraktionierten Abbau durch die Fermente betrachtet werden.

Es war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die fraktionierte Anwendung des Trypsins und Erepsins, wie schon früher bei der Einwirkung auf Natureiweißstoffe, so auch jetzt bei den Versuchen an Modellen, neue Gesichtspunkte zur Beurteilung des Fermentwesens eröffnen würde. Die fraktionierte Verdauung wurde an drei Substraten durchgeführt und zwar am Leucyl—glycyl—tyrosin, am Leucyl—triglycyl—tyrosin und am Leucyl—triglycyl—phenylalanin.

Zunächst wurde das Leucyl—glycyl—tyrosin mit Trypsin-Kinase behandelt, bis ein weiterer Zusatz von Enzym keine Hydrolyse mehr erkennen ließ, sodaß also zum Schluß keine

Substanz in der Lösung war, die durch Trypsin-Kinase angegriffen wurde.

Durch die Abscheidung von Tyrosin, die in deutlicher Menge erfolgte, dürfte der Beweis erbracht sein, daß die Bindung dieser Aminosäure mit dem Rest Leucyl—glycin gelöst war. Daß Leucyl—glycin für Trypsin-Kinase unangreifbar befunden wird, haben schon E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck gezeigt. (1. c.) Dagegen ist dieses Dipeptid als spezifisches Substrat des Erepsins bekannt. Es ist deshalb als den Erwartungen entsprechend anzusehen, wenn bei der auf Trypsinverdauung folgenden Erepsineinwirkung weiterhin ein starker Zuwachs an Carboxyl beobachtet wurde, was auf eine Verdauung des restierenden Peptids zurückzuführen ist. Entsprach dieser Verlauf den theoretischen Voraussetzungen so zeigte sich doch ein unerwartetes neues Verhalten des d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins.

Seit E. Fischers Untersuchungen galt nämlich die Ansicht als gesichert, daß für die Spaltbarkeit von Peptiden die sterische Konfiguration der an ihrem Aufbau beteiligten Aminosäurereste maßgebend sei, da nur die aus den natürlich vorkommenden Aminosäureantipoden aufgebauten Peptide enzymatisch zerlegbar gefunden wurden. Die Auswahl der auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüften racemischen oder optisch aktiven Peptide scheint indessen unzureichend gewesen zu sein, wie sich aus der Untersuchung des d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins ergibt. Nach den bisher geltenden Ansichten war nämlich zu erwarten, daß eine enzymatische Hydrolyse nur die eine Hälfte des Peptides betreffen könne, daß also höchstens 50 % einer Peptidbindung lösbar seien. Die Messungen ergaben indes, wie aus dem praktischen Teil dieser Abhandlung ersichtlich ist, einen bedeutend höheren Wert. Darnach betrifft die Hydrolyse dieses Peptides mit Trypsin-Kinase, die mit der Abspaltung des Tyrosins ihr Ende findet, jeweils die beiden optischen Antipoden der Racemate, also auch die den d—Leucinrest enthaltende Komponente. Für die Angreifbarkeit durch Trypsin, das sich zur Anlagerung an das Substrat der freien Carboxylgruppe bedient, scheint darnach die Konfiguration der der spaltbaren Peptidbindung nicht benachbarten Aminosäurereste belanglos zu sein. Die Hydrolyse des Tripeptids durch Erepsin, die von der freien Aminogruppe her einsetzt, scheint dagegen einen asymmetrischen Verlauf zu nehmen.

Ein mit Erepsin allein angesetzter Versuch zeigt jedenfalls, daß das Erepsin nur an die eine Hälfte des racemischen Leucins sich anlagert, das heißt also, daß die Versuchszahlen keinen Anhaltspunkt dafür lassen, daß die Hydrolyse über das nach E. Fischers Ansichten errechenbare Maß hinaus erfolgt ist.

Im nämlichen Sinn, wie beim d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin, verlief auch die fraktionierte Hydrolyse des d,l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosins, das ja von vornherein als für Erepsin unangreifbares

Substrat bekannt war ⟨s. w. o.⟩. Nach einer Vorbehandlung mit Trypsin-Kinase, also nach Abspaltung der Tyrosinkomponente, wurde der Rest, d,l—Leucyl—triglycin, der Erwartung entsprechend durch Erepsin weiter hydrolysiert. Auch dieses Peptid ⟨d,l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosin⟩ zeigte, wie das d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin, eine Spaltbarkeit durch Trypsin, die beide optische Komponenten, d- und l-Form betraf. Durch die nachfolgende Erepsinverdauung wurde indes deutlich erwiesen, daß für die Verdauung des d,l—Leucyl—triglycins mit Erepsin nur der eine der beiden optischen Antipoden in Frage kommt.

Das Pentapeptid d,l—Leucyl—triglycyl—d,l—phenylalanin wurde in der gleichen Weise zum fraktionierten Abbau herangezogen und ergab die erhofften Befunde: Es ließ sich durch Trypsin-Kinase erwartungsgemäß bis zu 50 % einer Bindung verdauen, woraus folgt, daß auch hier nur das carboxylhaltige d,l—Phenylalanin seinen Einfluß auf die Spaltbarkeit geltend macht, während der nicht benachbarte d,l—Leucinrest ohne jede Wirksamkeit ist. Die auf Trypsinverdauung folgende Erepsineinwirkung ergab natürlich durch Hydrolyse des d,l—Leucyl—triglycins einen weiteren Zuwachs an Spaltprodukten. Die Uebertragung dieser Operationen auf die Eiweißforschung läßt für die Erkenntnis der Natur dieser Stoffe manchen Vorteil erhoffen. So wird es zum Beispiel notwendig sein, nachdem die Zahl und Art der Bausteine im einzelnen Eiweißkörper genau bekannt ist, synthetische Modelle darzustellen ⟨unter Verwendung dieser Eiweißbausteine⟩ und diese dem fraktionierten Abbau zu unterwerfen. Aus der rein mathematischen Auswertung der Resultate des fraktionierten Abbaus von Naturkörper und desgleichen vom bekannten Modelle, dürfte es nicht allzu schwer sein, sichere Schlüsse auf die Konstitution der Eiweißmaterie zu ziehen. Wenngleich gewiß bis dahin noch viel Laboratoriumsarbeit geleistet werden muß, darf man doch annehmen, daß die völlige Aufklärung dieser widerstrebendsten aller Naturstoffe bald zu erwarten ist.

Aus den vorstehenden Versuchen läßt sich weiterhin eine Aenderung für die Nomenklatur der Enzyme als notwendig erachten. Dem in früheren Literaturstellen zum Unterschied vom Trypsin als Peptidase bezeichneten Erepsin kann nach den vorliegenden Ergebnissen dieser Name als Unterscheidungsmerkmal vom Trypsin nichmehr gegeben werden, weil ja auch für das Trypsin nunmehr peptidspaltende Wirkung festgestellt wurde.

Auch die vielfach diskutierte Frage einer gegenseitigen Vertretbarkeit beider Fermente ist endgültig zu verneinen. Wenngleich beide Enzyme auf manche Substrate, jedes für sich, einzuwirken vermögen, so darf dies doch nicht im Sinne einer gegenseitigen Vertretbarkeit gedeutet werden. Die vorstehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß der in solchen Fällen feststellbare Carboxylzuwachs von einem jeweils ganz verschiedenen Abbau des gespaltenen Peptids herrührt. Die Wirkungen

der Enzyme können sich also wohl überdecken, wie beispielsweise bei der Hydrolyse des Leucyl—glycyl—tyrosins, wo durch Erepsin allein zunächt Leucin abgespalten und das restliche Glycyl—tyrosin weiter in Glykokoll und Tyrosin zerlegt wird. Beim Angriff des Trypsins dagegen wird zuerst und ausschließlich die Tyrosinkomponente vom Leucyl—glycyl—tyrosin abgetrennt. Es ist also lediglich der titrimetrische Befund in beiden Fällen der nämliche und es ist bei einem großen Molekül wohl denkbar, daß beide Fermente zahlenmäßig denselben Zuwachs an Carboxyl bringen, ohne daß die gleichen Bindungen von den verschiedenen Proteasen angegriffen zu sein brauchen.

Die Hydrolyse des Phenylalanyl—arginins, des Phenylalanyl—glycins und ⟨nach E. Abderhalden⟩ des Glutaminyl—tyrosins durch beide Fermente, wobei im Falle der Erepsinspaltung vom freien NH_2 her, im Falle der Trypsinspaltung vom freien COOH her, der Angriff erfolgt, dürfte dem von Kuhn bei der Zuckerspaltung gemachten Befund mit Fruktosaccharase und Glukosaccharase als Parallele zur Seite gestellt werden.

Da nach dem weiter oben Gesagten das optische Verhalten der der freien COOH-Gruppe nicht benachbarten Aminosäurereste eines Peptides für die Angreifbarkeit durch Trypsin belanglos ist, besteht die Möglichkeit nach einer zweiten Haftstelle für das Trypsin dadurch zu suchen, daß man optisch aktive beziehungsweise racemische Peptide oder Acylderivate von solchen untersucht, deren der freien COOH-Gruppe benachbarte Aminosäurekomponente optisch ausgezeichnet ist ⟨zum Beispiel d,l oder Racemat⟩. Zeigt es sich nun zum Beispiel beim d,l—Bromisocapronyl—l—tyrosin, daß die Peptidbindung zu mehr als 50 % gelöst wird, so ist anzunehmen, daß eine zweite Anlagerung des Trypsins an der CONH-Bindung kaum erfolgt ist. Wird dagegen die Bindung nur zur Hälfte aufgespalten, also die eine optisch aktive Komponente verschont, so zeigt diese Reaktionsweise, daß der racemische Rest selbst an der Fermentreaktion beteiligt ist, daß also das Trypsin sich der CONH-Bindung als zweiter Haftstelle bedient. Das Erepsin wird nach ähnlichen Gesichtspunkten zu untersuchen sein, unter entsprechender Berücksichtigung der Tatsache, daß hier der Fermentangriff an der freien NH_2-Gruppe einsetzt. Allerdings sind für das Erepsin noch keine Beobachtungen bekannt, derart, daß das optische Verhalten der der freien NH_2-Gruppe nicht benachbarten Peptidbausteine ohne Einfluß auf die Spaltbarkeit eines Peptides durch Erepsin ist. Es wird deshalb nötig sein an einem großen Peptidmaterial umfassende Spaltungsversuche anzustellen um die Frage nach der zweiten Haftstelle einwandfrei beantworten zu können. Sicher darf man aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen den Beweis als erbracht ansehen für eine von R. Willstätter [1]⟩ schon früher geäußerte Ansicht, nämlich „daß die

[1]⟩ Ztschrft. physiol. Chem. 125. S 132.

Fermente . . . . . entgegen den von A. Fodor ‹Das Ferment-problem, Th. Steinkopf 1922› entwickelten Vorstellungen, nicht als mehr oder weniger spezifische Protoplasmabestandteile nur von besonderer Dispersität, sondern als bestimmte und unterscheidbare chemische Individuen reagieren".

IV. Proteolytische Spezifität und Eiweißstruktur.

Für die Betrachtung der Struktur der Eiweißkörper ergeben die vorliegenden Versuche einige neue Befunde, zum Teil sind sie für bisher schon angenommene strukturelle Eigentümlichkeiten beweisend. So deutet die an Diketopiperazinen gemachte Feststellung der Unangreifbarkeit durch Trypsin-Kinase sowohl wie durch Erepsin, erneut auf die schon von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner ausgesprochene Meinung hin, daß Diketopiperazine im Eiweißmolekül nicht vorkommen. Nach unseren jetzigen Kenntnissen läßt sich diese Ansicht noch dahin präzisieren, daß Dioxopiperazine im Eiweißmolekül überhaupt nicht vorkommen können — unter der Voraussetzung, daß dieses durch Trypsin und Erepsin zusammen bis zur vollkommenen Hydrolyse abgebaut wird — da ja die für Erepsin notwendige Voraussetzung der Gegenwart einer freien NH_2-Gruppe, wie auch die für Trypsinverdauung unentbehrliche freie Carboxylgruppe nicht vorhanden ist. Auch die an Protaminen und Proteinen festgestellte Tatsache, daß der Zuwachs an freiem NH_2 dem an freiem Carboxyl entspricht ist nur mit den in jedem Fall an synthetischem Material gemachten Befunden vereinbar, nämlich, daß durch die proteolytischen Enzyme, Trypsin-Kinase und Darmerepsin, nur Peptidbindungen gelöst werden, wodurch naturgemäß gleichzeitig Freilegung der beiden Gruppen erfolgt.

Zur Beurteilung der Proteinstruktur wird die Tatsache nicht unwesentlich sein, daß die Anteile der Enzyme an der Hydrolyse bestimmte Bruchteile der insgesamt lösbaren Peptidbindungen umfassen. Für die nur durch Trypsin-Kinase und Erepsin in wechselnder Reihenfolge vollständig verdaubaren Eiweißkörper, deren es eine ganz Anzahl gibt, ist die Annahme einer Struktur im Sinne E. Fischers, nämlich die der Bildung langer Peptidketten die wahrscheinlichste. Vielleicht ist die von Meyer und Mark [1]) für die Konstitution der Cellulose und des Seidenfibroins geäußerte Meinung, die die Existenz von Micellen für diese hochmolekularen Naturstoffe annimmt, auch auf die Eiweißmaterie allgemein zu übertragen. Als „Kristallite" müßten lange Peptidketten von regelmäßigem gleich oder ungleich langem Bau angenommen werden, die unter sich wieder durch Micellarkräfte in Zusammenhang stehen.

[1]) B. 61. S. 593, 1932, 1936, 1939.

B. Experimenteller Teil.

I. Ueber die Darstellung von Polypeptiden.

Herrn geh. Medizinalrat Prof. Dr. E. Abderhalden in Halle a./S., unter dessen Anleitung ich mir die Methoden der Peptidsynthese zu eigen machte, danke ich an dieser Stelle ergebenst für seine stete Unterstützung und Fürsorge und für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Es ist für den Eiweißchemiker keine besonders erfreuliche Aufgabe, wenn er sich mit der Synthese von Polypeptiden zu befassen hat. Denn abgesehen von der langwierigen durch Wochen und Monate dauernden Arbeit die zur Synthese jedes höheren Polypeptids erforderlich ist, bieten die einzelnen Aminosäuren selbst je nach Art und Konstitution recht erhebliche Schwierigkeiten bei der Kupplung. Ich habe alle von E. Fischer bei seinen großartigen Peptidsynthesen angewandten Methoden zur Darstellung meiner Präparate herangezogen. Die Darstellung des d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins zum Beispiel versuchte ich durch Kupplung von α-Bromisocapronyl—glycylchlorid und freiem l—Tyrosin unter Verwendung von Natronlauge oder durch Kupplung des nämlichen Clorids mit Tyrosinester, beide Komponenten in Chloroform oder auch Aether gelöst. Eine Hauptschwierigkeit bestand dabei in der Herstellung des Chlorids. Sowohl die Chlorierung des α—Bromisocapronyl—glycins mit PCl_5 und Acetylchlorid, wie die mit Thionylchlorid schlugen dabei fehl, weil meist weniger als 50 % Chlorid gebildet wurden. Eine Reinigung dieses dickflüssigen Oeles war aussichtslos, ganz abgesehen von den schlechten Ausbeuten. Die trotzdem mit dem unreinen Produkt vorgenommenen Kupplungen führten zu negativen Resultaten. Versuche, das Leucyl—glycyl—chlorid mit der Tyrosinkomponente zur Reaktion zu bringen, scheiterten an der übergroßen Empfindlichkeit des Präparates gegen Wasser. Ich hatte diese Wege zur Darstellung des Peptides in zahlreichen Versuchen eingeschlagen, weil im Falle des Gelingens die Kosten für das fertige Peptid, wegen des hohen Tyrosinpreises, erheblich billiger gewesen wären, als sie nach dem von E. Abderhalden und N. Schapiro ausgearbeiteten Verfahren zur Darstellung der optisch aktiven Körper d— beziehungsweise l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin [1]

[1] Fermentf. IX. S. 234.

sind. Nachdem jedoch die oben angeführten Versuche (bei denen natürlich größte Rücksicht auf Temperatur, Trockenheit, Reinheit der Reagenzien und so weiter genommen wurde) zu keinem befriedigenden Resultate geführt hatten, ging ich zur Darstellung des d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins nach der für die optisch aktiven Körper gegebenen Vorschrift von E. Abderhalden und Schapiro über. Diese, im Prinzip von E. Fischer bei seinen meisten Peptidsynthesen angewandte Methode, nämlich der stufenweise Aufbau durch Kupplung von Halogenfettsäurehalogenid an Aminosäuren beziehungsweise Peptide, mit nachfolgender Aminierung durch 25 %iges Ammoniak, hat von allen Möglichkeiten zur Peptidsynthese die meiste Aussicht auf Erfolg. Bei der Darstellung von einfachen Ketten, zum Beispiel Tetraglycylglycin, ergibt diese Art der Peptidgewinnung fast quantitative Resultate. Auch zur Schaffung von Abkömmlingen des Tyrosins verdient diese Methode vor allen anderen den Vorzug.

Das aus Glycyl—l—tyrosin und d—l—α—Bromisocapronylbromid dargestellte d—l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin zeigt bei allen Entwicklungsstufen das von Abderhalden für die optisch aktiven Körper angegebene Verhalten. Lediglich im Drehwinkel stimmen die für α_D berechneten Größen nicht überein. Während Abderhalden und Schapiro für ihr Präparat im Falle des l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins $\alpha_D = -30{,}9^0$ und bei d—Leucyl—glycyl—l—tyrosin $\alpha_D = +32{,}8^0$ angeben, finde ich für das d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin ein α_D von $= +41^0$. Ich habe diesen Winkel bei verschiedenen Präparaten nachgeprüft. Nach der Angabe Abderhaldens und Schapiros berechnet sich aber für das racemische Leucyl—glycyl—l—tyrosin ein α_D von annähernd 0^0. Es würde also hier der kaum denkbare Fall eintreten, daß ein optisch aktiver Körper (l—Tyrosin) kein Drehungsvermögen zeigt, was um so befremdlicher erscheint, da auch das Glycyl—l—tyrosin eine starke Rechtsdrehung aufweist.

Erweist sich also, nach dem weiter oben Gesagten, die Chlorierung von Halogenacylpeptiden für die Peptidsynthese als kaum empfehlenswerte Methode, so ist sie doch in anderen Fällen von Vorteil, nämlich dort, wo das entstehende Halogenfettsäurechlorid nicht, wie in dem oben geschilderten Beispiel, als ölige Flüssigkeit, sondern als fester Körper gewonnen werden kann. Es gelingt hier eine gute Reinigung des Chlorids und die nachfolgende Kupplung mit einer Aminosäure ist meist erfolgreich. Jedoch sind dabei verschiedene Kleinigkeiten zu beachten, die aber von entscheidendem Einfluß auf die ganze Arbeit sind. Ich will versuchen am Beispiel der Darstellung des d—l—Leucyl—triglycyl—d—l—phenylalanins, die ich durchgeführt habe, alles Wesentliche zu beschreiben, zumal diese Synthese zu einem neuen, bisher unbekannten Pentapeptid geführt hat. Nach den Angaben E. Fischers gewinnt man zunächst aus Glykokollesterchlorhydrat das Glycinanhydrid. Die genaue Einhaltung der Temperatur von -5^0 und das Ein-

tragen der NaOH in möglichst kurzer Zeit verbessern die Ausbeute. Zur weiteren Kupplung mit Chloracetylchlorid ist es nötig, daß das Glycinanhydrid chemisch rein ist und nicht Glykokollhaltig befunden wird, wie dies bei käuflichen Präparaten öfter der Fall ist. Diese Verunreinigung genügt nämlich manchmal schon um alle Arbeit illusorisch zu machen. Bei der Aminierung des Chloracetyl—glycyl —glycins zum Diglycyl—glycin ist es durchaus notwendig, sich an die Vorschrift von E. Abderhalden [1] zu klammern und jede Temperaturerhöhung zu vermeiden. Vor der Weiterverarbeitung des Tripeptids zum α—Bromisocapronyltriglycin muß es ebenso, wie vorher das Glycinanhydrid vollständig analysenrein sein. Man sollte es sich zum Grundsatz machen in der Eiweißchemie nur reinste Präparate zu verarbeiten, da man sich damit viel Aerger sparen kann. Das Bromisocapronyl—triglycin erhält man am leichtesten aus Bromisocapronylchlorid, wogegen das Bromisocapronylbromid aus ungeklärten Gründen bei der Kupplung mit Diglycyl—glycin nicht das an Ausbeute und Reinheit gleiche Präparat liefert. Nachdem man auch hier wieder die von Abderhalden für diese Stufe angegebenen Reinheitsproben durchgeführt hat, [2] geht man zur Chlorierung des Bromisocapronyl—triglycins über, die nach der Vorschrift von E. Fischer erfolgt. Dabei ist zu beachten, daß man vor allem eine mehlfeine Substanz zur Anwendung bringt. Die Ausbeute an Chlorid wird besser, wenn man das Reaktionsgemisch ungefähr zwei Stunden auf der Schüttelmaschine beläßt, statt der von E. Fischer angegebenen Frist von 30 Minuten. Die von E. Fischer zu seiner Filtration des feuchtigkeitsempfindlichen Chlorids benützte Apparatur habe ich etwas abgeändert. Es erwies sich nämlich als zweckmäßig statt der früher verwendeten Tonfilter, welche die Filtration zu einem langen zeitraubenden Prozeß gestalteten, Jenaer Glasfilternutschen in die Apparatur einzubauen. Dabei erwiesen sich Nutschen von 5 cm Durchmesser am zweckmäßigsten. Die Nutsche wurde mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen, in dessen drei Oeffnungen Glasröhren (mit Glashähnen versehen) eingeführt wurden. Die eine dieser Röhren führte zu einem mit P_2O_5 beschickten Trockenturm und dann unter Vorlage einer Schwefelsäurewaschflasche an die Luft, sodaß also durch dieses Rohr trockene Luft angesaugt werden konnte. Die zweite Röhre diente der Zufuhr von Waschflüssigkeiten, die dritte gab den Anschluß an die Wasserstrahlpumpe, um die Waschflüssigkeiten, Acetylchlorid und Petroläther, anzusaugen. Die ganze, früher mehrere Stunden dauernde Operation, läßt sich so auf einige Minuten zusammendrängen. Zweckmässig bringt man sofort die ganze Nutsche nach der Filtration in den P_2O_5-Exsikkator, da das getrocknete, (also von Acetylchlorid und Petroläther freie) Halogenacylpeptidchlorid sich leichter aus der Nutsche herausbringen läßt und weniger feuchtigkeitsempfindlich ist als das petrolätherfeuchte. Die Kupplung

[1] Abderhalden, Handbuch d. biochem. Arbeit. Abt. I, Teil 7. S. 846.
[2] Handb. d. bioch. Arb. Abt. I, Teil 7. S. 851.

des Chlorids mit d—l—Phenylalanin erfolgte dann nach folgendem Verfahren:

Man löst 3 Gramm feingepulvertes d—l—Phenylalanin in 30 ccm n/1 Natronlauge und kühlt auf 0° ab. Abwechselnd gibt man dazu in Portionen unter kräftigem Schütteln 4,5 g Bromisocapronyl—triglycyl—chlorid und 17 ccm n/1 NaOH, wobei stets auf Einhaltung einer tiefen Temperatur zu achten ist. Nachdem alles eingetragen ist, wird mit Salzsäure angesäuert und das Kupplungsgemisch mehrere Stunden bei 0° stehen gelassen. Dabei scheidet sich das Bromisocapronyl—triglycyl—phenylalanin in schönen Nadeln aus. Durch Einengen der Mutterlauge läßt sich eine weitere Menge des Kupplungsproduktes gewinnen. Das Rohprodukt wird aus heißem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 4 g.

Der Schmelzpunkt des aus Wasser umkristallisierten Präparates war 176°.

Kjeldahlbestg: 0,0278 g eines bei 80° im Vakuum über P_2O_5 getrockneten Materials ergaben bei der N_2-Bestimmung nach Kjeldahl einen Verbrauch von 2,11 ccm n/10 H_2SO_4. ⟨Ber. 2,12 ccm⟩.
Gefunden 10,87 % N_2. ⟨Ber. 10,92 % N_2⟩.

Zur Darstellung des Leucyl—triglycyl—phenylalanins wird der reine Bromkörper, Bromisocapronyl—triglycyl—phenylalanin, mit der fünffachen Menge 25 %igen Ammoniaks versetzt und bei 37° einige Zeit sich selbst überlassen, bis alles Brom abgespalten und durch NH_2 ersetzt ist. Man erkennt diesen Moment leicht durch eine Halogentitration nach Volhard, indem man eine Probe der Reaktionsflüssigkeit auf ihren Halogengehalt titriert und darnach eine gleich große zweite Portion mit NaOH kocht und wieder mit Silbernitrat den Halogengehalt bestimmt. Je nachdem beide Werte differieren ist die Lösung noch längere oder kürzere Zeit stehen zu lassen. Allzulange Einwirkung des Ammoniaks führt zu Nebenprodukten, die sich unter Umständen recht unangenehm bemerkbar machen, wenn man die aminierte Substanz aufarbeiten will. Man dampft, sobald die Aminierung beendet ist, die Lösung zur Entfernung des freien Ammoniaks bei tiefer Temperatur, nicht über 45°, im Vakuum zur Trockene ein und nimmt dann wieder mit viel Wasser auf. Um das außerordentlich leicht lösliche Pentapeptid vom NH_4Br zu befreien, ist es nötig die Silbersulfatmethode zur Anwendung zu bringen. Dieses, von E. Fischer eingeführte und von E. Abderhalden weiter ausgearbeitete und verbesserte Verfahren, ist die beste Methode um Ammoniakhalogenide von den Peptiden zu trennen, da die Ausbeute nur wenig dadurch vermindert wird. Da bisher keine genaue und zusammenhängende Beschreibung dieser Methode zur Beseitigung der Ammoniumhalogenide vorzuliegen scheint, will ich sie hier geben:

In die stark verdünnte, wässrige Lösung gibt man etwas mehr als die zur Bindung des gesamten Halogens nötige Silbersulfatmenge in festem Zustand hinein und schüttelt einige Stunden auf der Maschine. Ein allzugroßer Silberüberschuß ist dabei zu vermeiden, weil manche Peptide leicht schwerlösliche Silbersalze zu bilden vermögen. Gibt in einer filtrierten Probe der Lösung ein Zusatz von Silbernitrat keinen Niederschlag mehr, so filtriert man ab, nötigenfalls durch ein Tierkohlefilter, wobei jedoch nicht vergessen werden darf, daß Tierkohle leicht Peptide zu adsorbieren vermag, weshalb man tunlichst die Verwendung dieses Reagenzes vermeiden sollte. In das klare Filtrat wird nun zur Entfernung des überschüssigen Silbers kurze Zeit Schwefelwasserstoff eingeleitet, wobei darauf zu achten ist, daß keine kolloide, die Filtration störende, Lösungen entstehen. Das klare Filtrat vom Silbersulfidniederschlag wird durch Einleiten von Luft vom H_2S-Ueberschuß befreit. Nun wird das in der Flüssigkeit noch vorhandene Schwefelsäure—ion durch Zugabe der berechneten Menge Barytlösung ausgefällt. Man muß dabei solange zum Schluß Barytlauge beziehungsweise H_2SO_4 zugeben, bis durch keines dieser Reagenzien eine Trübung mehr entsteht. Die $Ba(OH)_2$-Lösung gewinnt man aus reinstem Baryumhydroxyd, das man zuvor noch aus Wasser umkristallisiert. Durch vorsichtige Filtration der gesättigten (1/3n) $Ba(OH)_2$-Lösung, unter Ausschluß von CO_2, gewinnt man eine wasserklare Lauge, was zur Erkennung des Endpunktes der Sulfatfällung unbedingt nötig ist. An sich wäre es ja einfacher durch Kochen mit Bariumkarbonat die Entfernung des Sulfations zu bewirken, doch vertragen eine Reihe von Peptiden diese Behandlung nicht. Das Filtrat vom Bariumsulfatniederschlag wird im Vakuum bei einer Temperatur von nicht über 45° C eingeengt bis auf wenige ccm. Durch Zugabe von absolutem Alkohol läßt sich ein Teil des Leucyl—triglycyl—phenylalanins in amorphen Flocken ausfällen. Den Rest gewinnt man durch wiederholtes Eindampfen mit Alkohol in reinem Zustand. Das Peptid zeigt in alkoholfeuchtem Zustand stark hygroskopische Eigenschaften. Trocken ist es bedeutend beständiger. Die Substanz, bei 60° im Vakuum über P_2O_5 vier Stunden getrocknet, ergab folgende Werte:

Kjeldahlbestg: 0.0401 g Peptid verbrauchten 4.48 ccm n/10 H_2SO_4 (berechn. 4.47 ccm).

Dies entspricht einem gefundenen Wert von 15.62 % N_2 statt der berechneten 15.59 %.

Der Schmelzpunkt war, wie bei den meisten Peptiden, nicht genau zu ermitteln. Bei 100° begann die Substanz zu schäumen, bei 155° war alles geschmolzen.

II. Spaltbarkeit von Peptiden und Peptidderivaten.

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Verdauungsversuche gestatten kaum einen Einblick in den quantitativen Verlauf der

Proteolyse. Sie waren auch weniger zu diesem Zweck angestellt worden, als vielmehr mit dem Ziele eine Grenze des Spezifitätsbereiches der Enzyme zu ermitteln. Die peptidspaltende Wirkung der Fermente wurde jeweils durch Titration der freigelegten Carboxylgruppen nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz [1] festgestellt. Die Darstellung der Enzymlösungen erfolgte nach der Methode von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck [2] für das Trypsin, nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner [3] für das Erepsin. Für die Verdauungen mit Erepsin waren die Lösungen auf $p_H = 7{,}8$ eingestellt, für die Trypsin-Kinase-Versuche wurde ein p_H von 8,4 angenommen. Als Temperatur wurden 30° gewählt. Das Trypsin wurde 30 Minuten mit Enterokinase aktiviert. Selbstverständlich war jedes Enzym auf Freiheit von der anderen Peptidase hin untersucht.

Tabelle 5:

Einwirkung von Darmerepsin auf Peptide.

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	l—Leucyl—leucin	25.9	67	22	1.93	91
2	Glycyl—d,l—serin	8.2	33	5	0.27	27
3	Glycyl—d,l—serin	8.2	33	22	0.29	29
4	Alanyl—d,l—serin	9.5	33	5	0.06	5.5
5	Alanyl—d,l—serin	9.5	33	22	0.23	21.5
6	Alanyl—d,l—serin	22.5	67	22	0.87	34
7	l—Leucyl—d,l—methylisoserin	29.0	48	22	0.98	39
8	Glycyl—l—cystin	24.0	38	5	0.17	11
9	Di—l—leucyl—l—cystin	4.0	33	5	0.20	117
10	l—Leucyl—d—glutaminsäure	14.2	33	5	0.79	72
11	d,l—Phenylalanyl—d—glutaminsäure	37.8	67	22	0.29	11
12	d—Alanyl—l—tyrosin	10.1	38	5	0.44	55
13	Diarginintrinitrat	21.0	67	22	0.06	0
14	d,l—Alanyl—α—amino—n—buttersäure	21.7	48	22	0.63	25
15	d,l—Leucyl—α—amino—n—buttersäure	27.0	48	22	0.19	8

[1] B. 54. S. 2988.
[2] Ztschrft. physiol. Chem. 147. S. 286.
[3] Ztschrft. physiol. Chem. 151. S. 31.

Fortsetzung der Tabelle 5:

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
16	Glycyl—d,l—amino—n—capronsäure	23.5	48	22	0.63	25
17	d,l—Leucyl—α—amino—n—capronsäure	24.5	48	22	0.93	38
18	d,l—Leucyl—α—amino—n—capronsäure	31.6	48	22	1.03	40
19	Triglycin	23.6	38	3.25	2.37	94
20	Triglycin	23.6	38	19	3.18	128
21	d,l—Alanyl—diglycin	25.0	38	3.25	1.30	106
22	d,l—Alanyl—diglycin	25.0	38	19	1.90	114
23	Tetraglycin	29.8	38	3.25	0.74	90
24	Tetraglycin	29.8	38	17.5	3.07	126
25	Tetraglycin	29.8	38	41	5.36	222
26	d,l—Leucyl—triglycin	28.8	38	17.5	2.41	252
27	Pentaglycin	37.1	38	3.25	0.27	12
28	Pentaglycin	37.1	38	17.5	1.35	56
29	Pentaglycin	37.1	38	41	3.7	152
30	l—Leucyl—triglycyl—l—leucin	25.1	67	22	3.07	254
31	Hexaglycin	43.0	38	3.25	1.25	20
32	Hexaglycin	43.0	38	17.5	2.42	50
33	Hexaglycin	43.0	38	41	0.66	100
34	Leucyl—heptaglycin	26.5	38	5	0.66	63
35	Leucyl—heptaglycin	30.0	67	22	0.63	54
36	l—Leucyl—nonoglycin	16.6	67	22	0.52	100
37	l—Leucyl—triglycyl—l—leucyl—triglycyl—l—leucyl—nonoglycin	7.7	67	22	0.36	300
38	d,l—Phenylalanyl—glycin	9.9	33	5	0.37	41.5
39	d,l—Phenylalanyl—glycin	9.9	33	22	0.38	43
40	l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin	17.8	33	5	0.83	82

Fortsetzung der Tabelle 5:

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spalt. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
41	d—l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin	20	62	5	1.02	90
42	Glycyl—l—tyrosyl—glycin	13.5	33	5	0.67	73
43	Glycyl—d—alanyl—glycyl—l—tyrosin	8.9	33	5	0.97	200
44	d,l—Leucyl—triglycyl—phenylalanin	26.16	62	5	0.77	66
45	d,l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosin	14.9	38	5	0.03	0

Tabelle 6:

Einwirkung von Darmerepsin auf Dioxopiperazine.

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	Glycyl—d,l—alaninanhydrid	17.1	67	22	0.00	0
2	d—Alanyl—l—phenylalanin—anhydrid	21.0	67	22	0.04	0
3	Glycyl—d,l—serin—anhydrid	20.8	67	22	0.03	0
4	Phenyl—dioxo—piperazin	22.6	67	22	0.02	0

Tabelle 7:

Einwirkung von Erepsin auf Peptidderivate.[1]

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	Glycyl—glycin—carbonsäure	22.0	50	22	0.04	0

[1] B 61. S. 641 f. ⟨E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein.⟩

Fortsetzung der Tabelle 7:

Nr.	Substrat	Einwage mg	Ereps. Einheiten $\times 10^5$	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
2	Carbäthoxyl—glycyl—d—l—leucin	39.0	70	12	0.02	0
3	Carbäthoxyl—pentaglycin	46.9	50	22	0.07	0
4	Acetyl—glycyl—glycin	14.6	70	12	0.06	0
5	Acetyl—d,l—phenylalanyl—d—l—alanin	47.5	70	12	0.13	3
6	Benzoyl—triglycin	33.9	70	12	0.04	0
7	Benzoyl—tetraglycin	43.8	50	22	0.02	0
8	Benzoyl—pentaglycin	46.5	70	12	0.01	0
9	d—α—Bromisocapronyl—nonoglycin	90.2	48	22	0.06	0
10	d—α—Bromisocapronyl—triglycyl—l—leucyl—nonoglycin	72.5	48	22	0.09	0
11	Glycyl—d,l—leucinamid	34.2	70	12	1.69	43
12	Tetraglycin—amid	21.4	50	22	2.95	54
13	Carbäthoxyl—tetraglycin—amid	39.6	50	22	0.01	0

Tabelle 8:

Einwirkung von Trypsin-Kinase auf Peptide.

Nr.	Substrat	Einwage mg	Angew. Tryps. Einheiten	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	l—Leucyl—l—leucin	20.9	0.64	19	0.05	0
2	Glycyl—d,l—serin	7.6	0.28	5	0.05	0
3	d,l—Alanyl—serin	8.8	0.28	5	0.07	0
4	d,l—Alanyl—serin	8.8	0.28	17.5	0.10	0
5	d,l—Alanyl—serin	19.3	0.67	9	0.13	6
6	Glycyl—l—cystin	24	0.28	5	0.02	0
7	Di—leucyl—l—cystin	4.0	0.28	5	0.02	0
8	l—Leucyl—d—glutaminsäure	14.2	0.28	5	0.07	0

Fortsetzung der Tabelle 8:

Nr.	Substrat	Einwage mg	Angew. Tryps. Einheiten	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
9	d,l—Phenylalanyl—d—glutaminsäure	38.1	0.64	5	0.03	0
10	d—Alanyl—l—tyrosin	10.0	0.28	5	0.00	0
11	Diarginintrinitrat	24.3	0.64	19	0.01	0
12	d,l—Histidyl—glycin	19.8	0.52	8	0.02	0
13	Triglycin	23.4	0.48	3	0.05	0
14	Triglycin	23.4	0.48	18	0.05	0
15	d,l—Alanyl—diglycin	27.2	0.48	3	0.01	0
16	d,l—Alanyl—diglycin	27.2	0.48	18	0.05	0
17	Tetraglycin	30.6	0.48	3	0.00	0
18	Tetraglycin	30.6	0.48	16	0.05	0
19	d,l—Leucyl—triglycin	29.0	0.48	16	0.05	0
20	Pentaglycin	36.8	0.48	3	0.02	0
21	Pentaglycin	36.8	0.48	16	0.03	0
22	l—Leucyl—triglycyl—l—leucin	22.3	0.64	19	0.03	0
23	Hexaglycin	42.4	0.48	3	0.01	0
24	Hexaglycin	42.4	0.48	16	0.05	0
25	l—Leucyl—heptaglycin	31.7	0.48	5	0.01	0
26	l—Leucyl—heptaglycin	38.0	0.64	19	0.04	0
27	l—Leucyl—nonoglycin	26.3	0.64	19	0.04	0
28	l—Leucyl—triglycyl—l—leucyl—triglycyl—l—leucyl—nonoglycin	18.5	0.64	19	0.03	0
29	Phenylalanyl—glycin	9.1	0.28	5	0.15	18
30	Phenylalanyl—glycin	9.1	0.28	17.5	0.27	33
31	Phenylalanyl—glycin	18.1	0.28	9	0.21	13
32	d—Phenylalanyl—d—arginin	19.2	0.52	8	0.30	25
33	l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin	17.8	0.28	5	0.41	40
34	l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin	20.2	0.67	9	0.62	54
35	Glycyl—l—tyrosyl—glycin	13.5	0.28	5	0.30	33

Fortsetzung der Tabelle 8:

Nr.	Substrat	Einwage mg	Angew. Tryps. Einheiten	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
36	Glycyl—l—tyrosyl—glycin	14.8	0.67	9	0.15	15
37	Glycyl—d—alanyl—tyrosin	4.8	0.28	5	0.17	56
38	Glycyl—d—alanyl—tyrosin	11.1	0.50	9	0.43	60
39	Glycyl—d—alanyl—glycyl—l—tyrosin	8.9	0.28	5	0.40	82
40	Glycyl—d—alanyl—glycyl—l—tyrosin	3.6	0.33	9	0.20	101
41	d,l—Leucyl—triglycyl—d,l—phenylalanin	86.3	0.50	5	1.45	38
42	l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosin	16.8	0.48	5	0.35	12

Tabelle 9:

Einwirkung von Trypsin-Kinase auf Dioxopiperazine.

Nr.	Substrat	Einwage mg	Angew. Tryps. Einheiten	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	Glycyl—d,l—alanin-anhydrid	18.8	0.64	22	0.04	0
2	d—Alanyl—l—phenylalanin—anhydrid	17.6	0.64	22	0.04	0
3	Glycyl—d,l—serin—anhydrid	23.4	0.64	22	0.03	0
4	Phenyl—dioxopiperazin	25.5	0.64	22	0.05	0
5	Phenyl—methyl-dioxopiperazin	11.1	0.64	22	0.03	0

Tabelle 10:

Einwirkung von Trypsin-Kinase auf Peptidderivate. [1]

Nr.	Substrat	Einwage mg	Angew. Tryps. Einheiten	Zeit Std.	Aciditätszuwachs 0,05 n KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
1	Carbäthoxyl—glycyl—d,l—leucin	36.0	0.56	12	0.60	22
2	Acetyl—glycyl—glycin	14.6	0.56	12	0.23	14
3	Acetyl—d,l—phenylalanyl—d,l—alanin	43.8	0.56	12	0.76	24
4	Benzoyl—diglycin	36.8	0.96	17	0.63	18
5	Benzoyl—triglycin	27.4	0.56	12	0.16	9
6	Benzoyl—pentaglycin	57.8	0.56	12	0.00	0
7	Phtalyl—diglycin	61.8	0.96	17	2.45	46
8	Bromisocapronyl—nonoglycin	35.7	0.64	22	0.04	0
9	d,l—Bromisocapronyl—diglycin	36.1	0.48	7	0.04	0
10	d,l—Bromisocapronyl—glycyl—l—tyrosin	23.3	0.66	4	0.84	75
11	Chloracetyl—d—l—phenylalanin	55.6	0.46	7	2.06	45
12	Chloracetyl—l—tyrosin	40.1	0.46	4	1.20	38
13	Carbäthoxyl—glycyl—l—tyrosin	38.1	0.24	7	1.62	66
14	Benzoyl—glycyl—l—tyrosin	17.2	0.46	2	0.89	88
15	β—Naphtalinsulfonyl—l—tyrosyl—glycin	54.4	0.46	3	0.63	27
16	β—Naphtalinsulfonyl—l—tyrosin	31.5	0.46	5.5	0.03	0
17	Glycyl—d,l—leucin—amid	24.2	0.56	12	0.02	0
18	Carbäthoxyl—tetraglycinamid	32.1	0.56	12	0.01	0
19	Benzoyl—d,l—alanyl—decarboxy—leucin	24.0	0.48	8	0.03	0

[1] B. 61. S. 644 und B. 61. S. 2096. E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein.

III. Beispiele des fraktionierten enzymatischen Abbaus von Peptiden.

Der fraktionierte enzymatische Abbau von Polypeptiden versprach einen vertieften Einblick in die Wirkungsweise der proteolytischen Fermente. Nachdem rein qualitativ die Spaltbarkeit von verschiedenen Peptiden, sowohl durch Darmerepsin wie durch Pankreastrypsin festgestellt war, mußte die Untersuchung geeigneter Substrate bei fraktionierter Anwendung der Enzyme die weiter oben ausgesprochene Ansicht beweisen, daß nämlich der Angriff der Fermente auf das gleiche Substrat von verschiedenen Richtungen her erfolgt. Die Versuche wurden an Abkömmlingen des Tyrosins und an einem Phenylalaninpeptid durchgeführt. Die verwendeten Enzymlösungen wurden auch hier aus Darmschleimhaut und dem Glycerinauszug der Pankreasdrüse nach der Methode von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner beziehungsweise A. Harteneck (l. c.) gewonnen. Der Fortgang der Hydrolyse wurde mit 0.05 n alkoholischer Kalilauge und Thymolphtalein als Indikator durch Titration der freigelegten COOH-Gruppen nach R. Willstätter in 90 % igem Alkohol gemessen. Die Verdauung erfolgte für die Erepsinversuche bei einem p_H von 7,8, für die Trypsin-Kinase-Spaltungen bei $p_H = 8{,}4$ und einer Temperatur von 30° C.

Als erstes Polypeptid wurde das d,l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosin der Hydrolyse unterworfen. Dieses Peptid, an dem ja zuerst Spaltbarkeit durch Trypsin-Kinase festgestellt wurde, ist bekanntlich unangreifbar für Erepsin.

Tabelle 11:

Fraktionierte Hydrolyse von d,l—Leucyl—triglycyl—l—tyrosin.

Enzym	Einheiten (Er. = $\times 10^5$)	Einwage mg	Verbr. an 0.05 n KOH	Zeit Std.	für 100% Spaltg. e. Bindg. ber. ccm KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
Tr.-Kin.	0.5	16.0	+ 0.56	5	0.68	81.6
—	0.5	16.0	0.56	10	0.68	81.6
+ Tr.-Kin.	+ 0.28	12.6	+ 0	15	—	—
—	—	12.6	+ 0	25	—	—
+ Erepsin	+ 59	9.5	+ 0.25	30	0.40	61.4
—	—	9.5	0.33	40	0.40	81.0
—	—	9.5	0.48	50	0.40	118.0
—	—	9.5	0.48	65	0.40	118.0
+ Erepsin	+ 50	—	+ 0	75	—	—
—	—	—	+ 0	90	—	—

Wie die obenstehende Tabelle ersehen läßt, wurden die Versuche mit ziemlich großen Mengen von Enzym angestellt, um

eine möglichst weitgehende Hydrolyse zu erreichen. Die Proteolyse, die mit Trypsin-Kinase nach den bisher geltenden Ansichten ⟨s. weiter oben⟩ einen Wert von 50 % einer Peptidbindung hätte erreichen dürfen, erfolgte weit über das erwartete Maß hinaus bis zu 80 %. Der Ueberschuß von 30 % ist nur so zu erklären, daß für die Hydrolyse des Peptids durch Trypsin-Kinase lediglich die an der Aufspaltung selbst beteiligten Peptidbausteine von Einfluß sind, im vorliegenden Falle also das l—Tyrosin und möglicherweise das benachbarte Glycin. Dagegen erweist sich der am Anfang der Peptidkette stehende d,l—Leucinrest für den Angriff des Fermentes auf die endständige Aminosäure als belanglos. Trotz des großen Ueberschusses an Enzym und trotz erneuter Enzymzugabe war es indessen nicht möglich, über 80 % Spaltung einer Peptidbindung hinaus, etwa auf 100 % zu kommen. Ich führe dieses, keiner Endspaltung entsprechende, Ergebnis auf Hemmungserscheinungen durch das Leucyl—triglycin beziehungsweise das Tyrosin zurück. Bekanntlich sind derartige, durch Spaltprodukte verursachte Hemmungen der enzymatischen Hydrolyse auch in anderen Fällen beobachtet worden. Vielleicht spielen Enzymgifte, die in so minimaler Menge auftreten, daß sie der Analyse bei der Peptiduntersuchung entgangen sind, eine Rolle und verursachen die Hemmungserscheinungen bei der Proteolyse.

Die anschließend an den Trypsinversuch vorgenommene Weiterverdauung der Spaltprodukte mit Erepsin führte zu dem gewünschten Ende. Es konnte dabei nämlich ein Aciditätszuwachs von 118 % für eine Peptidbindung festgestellt werden. Da die restierenden 20 % d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosin für eine Erepsinhydrolyse nicht in Frage kommen und das abgespaltene Tyrosin kaum einen Einfluß auf das Erepsin hat, bleiben für einen Angriff dieses Enzyms nur noch die aus der Trypsinverdauung herrührenden 80 % d—l—Leucyl—diglycyl—glycin übrig. Dieses Tetrapeptid vermag drei Bindungen zu lösen und zwar, da der Angriff von der freien NH_2-Gruppe her erfolgt und ein Racemat vorliegt nach den für diese geltenden Regeln nur 50 % einer Bindung, für alle zusammen also 150 %. Diese 150 % Hydrolyse entsprechen aber 120 %, bezogen auf die ursprüngliche Einwage, weil ja durch das Trypsin nicht 100 % sondern nur 80 % d,l—Leucyl—triglycin abgespalten wurden.

Im gleichen Sinne verlief auch die fraktionierte Hydrolyse des zweiten Tyrosinspräparates, des d,l—Leucyl—glycyl—l—tyrosins. Auch hier ergab sich eine Aufspaltung des Peptides über die erwartete Höhe hinaus. Das Tripeptid erwies sich nämlich, wie sein höheres Homologes, zu 80 % einer Peptidbindung als durch Trypsin-Kinase spaltbar. Durch Ausfall von freiem Tyrosin ließ sich einwandfrei die Abspaltung dieser Komponente feststellen. Die nachfolgende Erepsinverdauung mußte einen größeren Wert ergeben als er sich aus der Aufspaltung des d—l—Leucyl—glycins errechnet, weil in diesem Falle auch noch die vom Trypsin verschonten 20 % Leucyl—glycyl—tyrosin mit verdaut werden. Wie die nachfolgende

Tabelle zeigt, läßt sich das d,l–Leucyl–glycyl–l–tyrosin durch Erepsin allein zu 100 % einer Peptidbindung hydrolysieren. Es werden demnach, da das Erepsin einer freien NH_2-Gruppe zum Angriff bedarf, zunächst 50 % der Bindung des Leucinrestes mit dem Glycyl–l–tyrosin aufgespalten, weil ja das Leucin als Racemat vorliegt. Die aus dieser Hydrolyse hervorgehenden 50 % Glycyl–l–tyrosin werden ihrerseits wieder zu 100 % vom Enzym aufgespalten, aufs Ganze bezogen zu 50 %, woraus sich dann ein Gesamtwert von 2×50 %=100 % einer Bindung ergibt.

Tabelle 12:

Fraktionierter Abbau von d,l–Leucyl–glycyl–l–tyrosin

Enzym	Einheiten ⟨Er.= ×10⁵⟩	Einwage mg	Verbr. an 0.05 n–KOH	Zeit Std.	für 100% Spaltg. e. Bindg. ber. ccm KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
Tr.-Kin.	0.5	32.90	1.5	5	1.88	80.1
–	0.5	32.90	1.5	10	1.88	80.1
+ Tr.-Kin.	+ 0.34	19.80	0	15	–	–
–	–	19.80	+0	25	–	–
+ E	59	15.00	+0.51	30	0.86	61
–	–	15.00	0.65	40	0.86	76
–	–	15.00	+0	50	–	–
+ E	+50	–	+0	60	–	–
–	–	–	+0	70	–	–

Tabelle 13:

Abbau von d,l–Leucyl–glycyl–l–tyrosin durch Erepsin

Einheiten ⟨Er.= ×10⁵⟩	Einwage mg	Verbr. an 0.05 n–KOH	Zeit Std.	für 100% Spaltg. e. Bindg. ber. ccm KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
118	17.20	0.68	2	0.98	69.4
118	17.20	0.93	10	0.98	94.8
118	17.20	1.02	20	0.98	101
118	17.20	1.02	30	0.98	101
+ 50	25.80	0	42	–	–
–	25.80	0	60	–	–

Das dritte in den Kreis dieser Betrachtungen gehörende Peptid war das d–l–Leucyl–triglycyl–d,l–phenylalanin. Ich führe zunächst in der nachfolgenden Tabelle die Versuchsergebnisse auf:

Tabelle 14:

Fraktionierter Abbau von d,l—Leucyl—triglycyl—d,l—phenylalanin

Enzym	Einheiten (Er.= $\times 10^5$)	Einwage mg	Verbr. an 0.05 n —KOH	Zeit Std.	für 100% Spaltg. e. Bindg. ber. ccm KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
Tr.-Kin.	0.5	22.80	0.22	5	1.01	21.7
—	0.5	22.80	0.37	15	1.01	36.5
—	0.5	22.80	0.47	20	1.01	46.5
—	0.5	22.80	0.47	25	1.01	46.5
+E	+94	13.77	+0.5	35	0.63	81.5
—	—	13.77	0.55	45	0.63	89.0
—	—	13.77	0.55	55	0.63	89.0
+E	+50	—	+0	65	—	—
—	—	—	+0	75	—	—

Beide endständige Aminosäurekomponenten dieses Peptids sind Racemate optisch aktiver Körper. Da das Leucyl—triglycin durch Trypsin nicht angreifbar ist, kann also in diesem Falle nur eine Bindung gelöst werden. Der höchste zu erwartende Wert wäre also 50 % Hydrolyse einer Bindung gewesen. Das erzielte Resultat kommt dieser Zahl recht nahe. Die nachfolgende Hydrolyse mit Erepsin zeigt naturgemäß höhere Werte als die Trypsinverdauung, weil ja in der Hauptsache Leucyl—triglycin hydrolysiert werden muß. Außerdem wird auch noch das von der tryptischen Komponente verschonte Pentapeptid mit ergriffen, was den hohen Erepsinwert zu erklären vermag. Die rein ereptische Hydrolyse des Pentapeptids, deren Resultate in der folgenden Tabelle aufgezeichnet sind, nimmt keinen übersichtlichen Verlauf. Der Einfluß der endständigen Racemate beeinflußt offenbar den ganzen Verlauf der Spaltung.

Tabelle 15:

Hydrolyse des d,l—Leucyl—triglycyl—d,l—phenylalanins durch Erepsin

Einheiten Erepsin $\times 10^5$	Einwage mg	Verbr. an 0.05 n —KOH	Zeit Std.	für 100% Spaltg. e. Bindg. ber. ccm KOH	% Spltg. bezog. a. 1 CONH-Bindg.
118	17	0.43	5	0.76	56.60
118	17	0.72	15	0.76	93.60
118	17	0.80	25	0.76	105
+ 50	—	0.0	35	—	—

Lebenslauf!

Am 25. Juni 1903 wurde ich in Freinsheim ⟨Pfalz⟩ als Sohn des Notariatsoberinspektors M. Schlatter geboren. Ich besuchte zunächst die Volkshauptschule in Frankenthal und trat dann in das Progymnasium dort über. Am hum. Gymnasium in Ludwigshafen am Rhein, das ich in der Folge besuchte, erhielt ich 1922 das Reifezeugnis. Ich begann an der Universität Heidelberg das Studium der Chemie und wechselte alsbald nach München über, wo ich 1925 den ersten und 1927 den zweiten Teil der Verbandsprüfung ablegte. Hierauf begann ich unter Leitung des Herrn Prof. E. Waldschmidt-Leitz meine Doktorarbeit, die ich an der Deutschen technischen Hochschule in Prag zu Ende führte, wohin ich meinem Lehrer gefolgt war.

Druck von Emil Hoffmann, Wolgast